

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES SSR E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *ANNONA CRASSIFLORA* MART. DO ESTADO DE GOIÁS**DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS SSR AND GENETIC CHARACTERIZATION OF NATURAL POPULATIONS OF *ANNONA CRASSIFLORA* MART. IN THE STATE OF GOIÁS****MARLEI DE FÁTIMA PEREIRA**

Endereço atual/Current address: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil/Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; e-mail: marleipereira@yahoo.com.br

Tese de Doutorado/Doctoral Thesis: Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/Postgraduate Program in Agronomy, Agronomy and Food Engineering College, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Defendida/Defended: 27.VII.2007

Orientador/Advisor: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Co-orientador/Co-advisor: Dra. Ana Yamaguishi Ciampi, Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Brasília, DF, Brasil/ National Center of Genetic Resources, Embrapa, Brasília, DF, Brazil.

Resumo: O conhecimento acerca da estrutura genética de uma população tem grande aplicação na conservação e no manejo da biodiversidade e pode ser obtido com o uso de marcadores moleculares microsatélites, os quais representam poderosa ferramenta na averiguação de parâmetros genéticos, como diversidade genética, fluxo gênico e deriva, entre outros. Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), baseados no polimorfismo de locos microsatélites, são codominantes, multialélicos e amplamente distribuídos no genoma dos eucariotos. Uma bateria de *primers* flanqueando locos microsatélites foi desenvolvida a partir de uma biblioteca genômica enriquecida (utilizando uma sonda TC₁₃) para *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), uma espécie frutífera do Cerrado que apresenta elevado potencial de utilização agrônômica, porém baixo grau de domesticação. Foi realizada a digestão do DNA total com a enzima *Sau3A1* e desenvolvidos 44 pares de *primers*, dos quais, cinco não amplificaram, um mostrou-se monomórfico e 38 apresentaram polimorfismo satisfatório entre temperaturas que variaram de 55°C a 60°C. Foram utilizados 30 indivíduos na análise de polimorfismo e os fragmentos gerados na PCR foram analisados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. Entre os locos polimórficos, 12 pares de *primers* foram selecionados para estudos genéticos com populações naturais de *A. crassiflora*. Os *primers* forward foram marcados com fluorocromos (6-FAM, HEX ou NED) e agrupados em sistemas multiplex para análise empregando analisador de fragmentos. A análise genética foi realizada utilizando-se 13 populações naturais da espé-

cie coletadas no estado de Goiás, tendo sido observado elevado nível de diversidade alélica por população, com média de 17 alelos por loco. Os valores para as heterozigosidades médias esperada (0,866) e observada (0,728) foram elevados, indicando alto nível de diversidade genética nas populações. Parte significativa dessa variação está distribuída entre as populações (9,1%), em conformidade com o grau de estruturação genética observado para outras espécies vegetais nativas do Cerrado. A análise de divergência genética demonstrou a formação de quatro grupos distintos de populações, evidenciando forte estruturação da variabilidade genética das populações no espaço. Os resultados obtidos sugeriram que a ocupação da região do Cerrado do estado de Goiás por parte da espécie se deu por deslocamento no sentido sudoeste-nordeste, tendo ocorrido a formação de dois gradientes de variação genética, dispostos em paralelo, mantidos em isolamento por uma barreira geográfica, denominada Vão do Paranã. A análise de estruturação intrapopulacional foi não significativa, denotando ausência de efeitos espaciais dentro das populações, provavelmente decorrente do fluxo de pólen e da dispersão de sementes a longas distâncias.

PALAVRAS-CHAVE: *Annona crassiflora*, marcadores moleculares, microssatélites, SSR.

ABSTRACT: The knowledge on the genetic structure of a population may be largely applied to the conservation and management of biodiversity and it can be acquired through the use of microsatellite molecular markers, which are powerful tools in determining genetic parameters, such as genetic diversity, gene flow, and genetic drift, among others. Simple Sequence Repeats (SSR), based on polymorphic microsatellite loci, are codominant, multiallelic, and largely distributed within eukaryotic genomes. A series of primers flanking microsatellite loci were developed from an enriched genomic library (using probe TC₁₃) for *Annona crassiflora* Mart. (*Annonaceae*), a Cerrado native species presenting high potential for agronomic use but low degree of domestication. Total DNA digestion was carried out with the enzyme *Sau3A1* and 44 pairs of primers were developed, among which, five did not amplify, one was monomorphic, and 38 showed satisfactory polymorphism in temperatures ranging from 55°C to 60°C. Analysis of polymorphism were performed in 30 individuals and the fragments generated in the PCR were analyzed using silver nitrate-stained polyacrylamide 6%. Among the polymorphic loci, 12 pairs of primers were selected for genetic studies with natural *A. crassiflora* populations from the state of Goiás. The forward primers of these 12 pairs were labeled with 6-FAM, HEX, or NED fluorochromes and grouped in multiplex systems in order to be analyzed in a fragment analyzer. The genetic analysis was performed in 13 natural populations of this species collected in the state of Goiás and a high degree of allelic diversity was observed per population, with an average of 17 alleles per locus. The values of expected (0.866) and observed heterozygosity (0.728) were high, showing high level of genetic diversity in the populations. A significant part of this variation is distributed among the populations (9.1%), which is consistent with the degree of genetic structure observed for other plant species from the Cerrado region. The genetic divergence analysis proved the occurrence of four distinct groups of populations, showing a strong spatial genetic variability structure among the analyzed populations. The results suggest that the occupation of the Cerrado region of the state of Goiás by this species occurred through dislocation of the species from the southwestern to the northeastern part of the area, forming two gradients of genetic variation, which are parallel and isolated from each other due to a geographical barrier, named Vão do Paranã. The analysis of intrapopulation genetic structure was not significant, showing lack of spatial effect within the populations, probably due to high pollen flow and long-distance seed dispersal.

KEY WORDS: *Annona crassiflora*, molecular markers, microsatellites, SSR.